研 究

中耳炎の骨破壊に関与する酵素

— マトリックスメタロプロテナーゼ-1の発現 —

楠 威志¹⁾・西田 升三²⁾³⁾・宮崎 和浩¹⁾
寺尾 恭一¹⁾・村田 清高¹⁾・戸村 隆訓²⁾

Metalloproteinase-1 in Human Chronic Otitis Media

Takeshi Kusunoki, Shozo Nishida, Katsuhiro Miyazaki,
Kyoichi Terao, Kiyotaka Murata and Takanori Tomura
(Kinki University)

We immunohistochemically examined expressions of metalloproteinase-1 (MMP-1) in both cholesteatoma and non-cholesteatoma granulation tissues. All 8 patients with cholesteatoma epithelia, 10 of 11 patients with cholesteatoma granulation, and 2 patients with cholesterin granuloma of 5 non-cholesteatoma patients exhibited expression of MMP-1. Histopathological examinations of these granulation tissues revealed proliferative fibroblast cells and many inflammatory cells with expression of MMP-1. Cholesteatoma subepithelial granulation (1 case) and non-cholesteatoma granulation tissues without cholesterin granuloma (2 cases) did not exhibit expression of MMP-1. Collagen fibers occupied the granulative tissues on histopathological examinations. However, fibroblast and inflammatory cells were rarely found.

Key words : metalloproteinase-1, chronic otitis media, cholesteatoma, collagenase

緒 言

真珠腫性中耳炎による骨破壊の作用機序の一つとして蛋白分解酵素が働くことが報告されている。Abramsonら¹⁾はヒト中耳真珠腫において蛋白分解酵素の一つであるコラゲナーゼが作用していることを報告している。現在、コラゲナーゼはその分解するマトリックス構成分子の違いによりマトリックスメタロプロテナーゼ(以下MMPと略す)として1, 2, 3, 7, 9, 10に分類されている²⁾。しかし、Abramsonらはコラゲナーゼがどの種類のマトリックスを主に分解するかについては論じていない。骨有機成分の大部分はI型コラーゲンで構成され

ている³⁾。そのI型コラーゲンを主に分解するMMP-1について検討することは、真珠腫の骨破壊機序解明の一つとして有意義であると考えた。本研究ではヒト慢性中耳炎症例の術後摘出標本を用いてMMP-1免疫染色を行った。それによって真珠腫上皮、上皮肉芽また非真珠腫性中耳炎肉芽についてMMP-1の発現を検討し臨床所見と比較検討した。

実験方法

1. 実験材料(表1)

真珠腫性中耳炎手術患者13例より摘出標本を得た。そ

1) 近畿大学耳鼻咽喉科学教室

2) 近畿大学生化学I教室

3) 近畿大学薬学部薬物治療学研究室

表 1 実験材料

真珠腫	上皮	8 例
	上皮下肉芽	11例(3)
非真珠腫性中耳炎		5 例(2)

() : コレステリン肉芽腫を合併した症例

のうち、真珠腫上皮を検討できたもの 8 例、上皮下肉芽については 11 例(そのうちコレステリン肉芽腫を認めたものは 3 例)であった。同一症例で両者を検討できたものは 6 例であった。非真珠腫性中耳炎手術患者 5 例より摘出標本を得た。全例肉芽性病変について検討した。そのうち 2 例にコレステリン肉芽腫を認めた。

2. MMP-1 の発現 (図 1)

方法は 10%ホルマリン固定後、常法に従いパラフィン包埋し、薄切切片を作製し免疫染色 ABC 法⁹⁾を用いた。パラフィン切片は脱パラフィン後、0.3%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼを阻止した。次に非特異的反応を抑制のため正常ウマ血清でブロッキングをした。その後、1 次抗体として MMP-1 抗体(富士薬品工業株)を用いて 4℃ 12 時間反応させた。その後ビオチン化 2 次抗体 (VECTOR) と室温 30 分間反応させ、さらにアビジン

(DAKO) とビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼ (DAKO) との混合液を室温で 1 時間反応させた。ビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼの発色は 0.03%過酸化水素入りジアミノベンチジン (DAKO) 液で発色させ、ヘマトキシリンで対比核染色を施した。後述する表 2 の染色性の記載において陰性を－、陽性を＋とした。なお、陰性コントロールとして 1 次抗体の代わりに Phosphate Buffered Saline を用い陽性像は得られなかった。

実験結果 (表 2)

真珠腫においては上皮は 8 例全例、上皮下肉芽 11 例中 10 例が陽性を示した。上皮下肉芽においては線維芽細胞の他炎症細胞に陽性を示した (図 2)。残りの真珠腫上皮下肉芽 1 例と非真珠腫性中耳炎肉芽の 5 例中 3 例は陰性を示した。それらの組織像は大部分が膠原線維で占められ炎症細胞はほとんど認められなかった (図 3)。陰性例を示した真珠腫上皮下肉芽症例は術中所見は真珠腫塊が上鼓室に局限し、耳小骨および耳小骨連鎖は保たれ炎症所見は乏しかった。非真珠腫性中耳炎 5 例中 2 例にコレステリン肉芽腫を認め、陽性像を示した。また組織像も真

表 2 MMP-1 免疫染色

症例	真珠腫		非真珠腫
	上 皮	上皮下肉芽	肉 芽
1	+	+	
2	+	+	
3	+	+	
4	+	+	
5	+	+	
6	+	(+)	
7	+		
8	+		
9		+	
10		+	
11		－	
12		(+)	
13		(+)	
14			－
15			－
16			－
17			(+)
18			(+)

＋：陽性 －：陰性

() : コレステリン肉芽腫合併症例

図 1 MMP-1 の免疫染色法

図 2 A MMP-1 陽性を示した真珠腫上皮(左側)および上皮下肉芽組織(右側). 上皮下肉芽組織では線維芽細胞および炎症細胞に陽性像を認めた(症例 5).

図 3 MMP-1 陰性の非真珠腫性中耳炎肉芽(症例14). 組織のほとんどが膠原線維であり, 線維芽細胞および炎症細胞は乏しかった.

図 2 B 図 2 A の□の範囲を強拡大にした. 左側矢印は真珠腫上皮の陽性像. 右側矢印は上皮下肉芽組織の線維芽細胞および炎症細胞の陽性像.

図 4 MMP-1 陽性を呈した非真珠腫性中耳炎のコレステリン肉芽腫(症例18). 真珠腫上皮下肉芽組織と同様に, 線維芽細胞および炎症細胞に陽性像を認めた.

珠腫上皮下肉芽の陽性症例と同様, 著しい線維芽細胞増生および炎症細胞浸潤像を認め陽性を示した(図 4). これらコレステリン肉芽腫を合併した非真珠腫性中耳炎は, その他合併のない非真珠腫性中耳炎とは違い, 陽性を示した真珠腫上皮下肉芽症例と同様, 耳小骨の溶解, 顔面神経, 硬膜の露出などの術中所見を呈していた.

考 察

真珠腫性中耳炎の際の骨破壊機序に各種プロテアーゼが働くという多くの報告がある. その骨組織の細胞間質の有機成分および骨膜などの結合組織はタイプ I コラーゲンが主成分である³⁾. そのタイプ I コラーゲンを

MMP-1 が分解できると報告されている²⁾. 本研究で, 真珠腫の MMP-1 の発現を免疫染色レベルで検討した結果, 真珠腫上皮 8 例全例と真珠腫上皮下肉芽 11 例中 10 例に陽性像を認めた. MMP-1 を産生する細胞として線維芽細胞, 炎症細胞に陽性所見が得られた. また真珠腫上皮下肉芽の陰性症例と非真珠腫性中耳炎のなかでコレステリン肉芽腫を合併していない症例は膠原線維が大部分で, 線維芽細胞, 炎症細胞がほとんどみられなかった症例では MMP-1 が陰性を示した. 逆に非真珠腫性中耳炎でもコレステリン肉芽腫を合併した症例は, 真珠腫上皮下肉芽の陽性症例と同様, つまり著しい線維芽細胞増生および炎症細胞浸潤像を認めた. そしてこれらの細胞が MMP-1

陽性を示した。また、術中所見も耳小骨の溶解、顔面神経、硬膜の露出など、陽性例を示した真珠腫上皮下肉芽症例と同様の所見を呈していた。このことから、非真珠腫性中耳炎も真珠腫性中耳炎と同様に、炎症性肉芽を形成している線維芽細胞、炎症細胞から MMP-1 を産生することにより骨病変を起していることが想定される。このことを考えれば真珠腫性中耳炎と同様の骨病変を伴う機能障害、合併症を起す危険が十分あることを念頭に置き日常診療にあたらなければならない。今回、我々は MMP-1 活性の測定は行っていないが、Abramson ら⁵⁾は、真珠腫上皮下組織の方が真珠腫上皮のコラゲナーゼ活性が高いとしている。森山⁶⁾は、*in vitro* の実験系においてラットの線維芽細胞に上皮抽出液を作用させ、コラゲナーゼ産生が高まったことを報告している。つまり上皮と上皮下肉芽との協調作用が真珠腫の骨破壊に関与している可能性があることを報告している。上皮成長因子(以下 EGF と略す)にはコラゲナーゼ活性を高める作用がある⁷⁾。後藤⁸⁾は、その EGF が真珠腫上皮に多く存在し、感染の際よくみられる debris に正常外耳道角化物より EGF 含量が多いとしている。これらの報告は真珠腫上皮と真珠腫上皮下肉芽は骨破壊に対し正の協調作用を思わせる。それに対し、コラゲナーゼを不活性化するとされている superoxidase dismutase (SOD)⁹⁾ が真珠腫上皮に多く存在する¹⁰⁾。このことも真珠腫上皮のコラゲナーゼ活性が真珠腫上皮下組織より低い一因とも考えられる。しかし、Parks ら¹¹⁾は感染が加わると SOD 量が低下すると報告している。今後、EGF のような MMP-1 生成および活性促進因子、逆に SOD や tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)¹²⁾ のような MMP-1 生成および活性抑制因子の相反する両因子に注目したい。そして、感染による EGF の増加、SOD の減少が MMP-1 の活性化を促進しているか否かについても検討したい。

ま と め

真珠腫性中耳炎および非真珠腫性中耳炎患者の摘出標本に対し免疫染色にて MMP-1 の発現を検討した。

1) 真珠腫上皮は 8 例全例と真珠腫上皮下肉芽は 11 例中 10 例が陽性を示した。非真珠腫性中耳炎肉芽 5 例中 2 例にコレステリン肉芽腫を合併した 2 症例も陽性を示した。これらの組織像は、真珠腫上皮下肉芽の陽性症例と同様、著しい線維芽細胞増生および炎症細胞浸潤像を認め陽性を示した。

2) 残りの真珠腫上皮下肉芽 1 例と非真珠腫性中耳肉芽においては 5 例中 3 例は陰性を示した。それらの組織像は大部分が膠原線維で占められ炎症細胞はほとんど認められなかった。

参考文献

- 1) Abramson M and Huang CC : Localization of collagenase in human middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope* **87** : 771~791, 1977.
- 2) 中島元夫 : 転移における癌細胞と宿主細胞のマトリックスメタロプロテアーゼの役割. *実験医学* **12** : 971~979, 1994.
- 3) Alberts B, Bray D, Lewis J, 他 : 細胞間接着, 細胞結合, 細胞外マトリックス(大隅良典, 小倉明彦, 桂 勲, 他監訳). *細胞の分子生物学*. 791~836頁, 教育社, 東京, 1990.
- 4) Hus SM, Raine L and Frageer H : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and immunoperoxidase techniques. *J Histochem* **29** : 577~580, 1981.
- 5) Abramson M and Gross J : Further studies on a collagenase in middle ear cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **80** : 177~185, 1971.
- 6) 森山 寛, 柏木博道, 矢部 武, 他 : 真珠腫における骨破壊の特異性 —collagenase 産生と上皮の関与—. *Ear Res Jpn* **17** : 168~179, 1986.
- 7) Chikuma T, Kato T, Hiramatsu M, et al : Effect of epidermal growth factor on dipetidyl-aminopeptidase and collagenase-like peptidase activities in cloned ostoblastic cells. *J Biochem* **95** : 283~286, 1984.
- 8) 後藤友佳子 : 上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) と真珠腫組織 —第一報 活動型真珠腫と非活動型真珠腫における EGF の局在の比較—. *日耳鼻* **93** : 1186~1191, 1990.
- 9) Burkhardt H, Hartmann F and Schwingel ML : Activation of latent collagenase from Polymorphonuclear leukocytes by oxygen radicals. *Enzyme* **36** : 221~236, 1986.
- 10) 頼 銘堂, 江草憲太郎, 小川晃弘, 他 : 真珠腫組織における SOD の検出. *日耳鼻* **99** : 1423, 1996.
- 11) Parks RR, Hung CC and Haddad JJr : Superoxide dismutase in an animal model of otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **252** : 153~158, 1995.
- 12) Khokha R, Waterhouse P, Yagel S, et al : Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP level confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science* **243** : 947~950, 1989.

(原稿受付 : 平成11年 3 月 16 日

原稿採択 : 平成11年 6 月 30 日

別刷請求先 : 楠 威志

〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東377-2
近畿大学耳鼻咽喉科学教室)